

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ESSAIS DE VACCINATION DU LAPIN ET DU COBAYE CONTRE L'INFECTION TUBERCULEUSE

par A. CALMETTE, L. NÈGRE et A. BOQUET.

Dans un précédent mémoire (1) nous avons exposé les résultats de nos expériences d'inoculation du bacille bilié de Calmette et Guérin aux petits animaux.

Ce bacille, d'*origine bovine très virulente*, cultivé en séries successives depuis quatorze ans sur milieu bilié, se montrait totalement privé de virulence, alors même que nous en injections 100 milligrammes en une seule fois dans le cœur du lapin et 50 milligrammes dans le cœur du cobaye. Ces injections *uniques* ne déterminaient qu'une tuméfaction ganglionnaire généralisée qui apparaissait deux semaines plus tard, persistait une dizaine de jours, puis s'effaçait sans laisser de traces. Les animaux sacrifiés après des délais variables jusqu'à trois mois ne présentaient aucune lésion tuberculeuse pulmonaire ou viscérale. Lorsqu'on les éprouvait au bout d'un mois par instillation oculaire avec une goutte d'émulsion concentrée de culture de bacille bovin virulent, ils accusaient une résistance manifeste. Alors que les témoins succombaient tous en deux à trois mois avec de gros ganglions du cou, pleins de pus caséeux, et des lésions généralisées à tous les organes viscé-

(1) Ces *Annales*, septembre 1921, 35, p. 561.

raux, les cobayes préalablement traités par injection intracardiaque de bacilles biliés restaient en bon état de santé, et ceux qu'on sacrifiait après trois mois étaient trouvés seulement porteurs d'un ou deux ganglions cervicaux contenant, au lieu de pus, un liquide clair, séreux, dans une coque fibreuse. Ce liquide ne renfermait que quelques rares bacilles. L'infection tuberculeuse d'épreuve se montrait donc presque inoffensive pour les cobayes qui avaient reçu du bacille bilié dans la circulation sanguine.

Cette constatation permettait d'envisager la possibilité de conférer au cobaye, au moins pour quelques mois, une véritable immunité contre la tuberculose expérimentale. Et comme une telle immunité n'a encore jamais pu être obtenue par l'un quelconque des procédés de vaccination qu'on a tenté d'essayer jusqu'à présent, il paraissait indiqué de poursuivre nos expériences à l'effet de rechercher quel peut être le meilleur mode d'introduction du bacille bilié et quelle est la durée de sa persistance dans l'organisme.

Nous ne relaterons dans ce mémoire que les essais de vaccination effectués sur le *lapin* et sur le *cobaye* par *diverses voies autres que la voie intestinale*.

Nous ferons connaître ultérieurement les résultats de ceux que nous avons entrepris en vue d'immuniser les mêmes animaux, soit dans leur tout jeune âge, soit à l'âge adulte, par la *voie digestive*.

I. — Essais de vaccination du lapin.

EXPÉRIENCE. — Le 17 octobre 1921, onze lapins pesant chacun 2 kilogr. à 2 kilogr. 500 reçoivent dans la veine marginale, en une seule injection, les uns 20 milligr., les autres 30 milligr. de bacilles biliés (culture de 24^e passage sur pomme de terre cuite dans la bile de bœuf, glycinée à 5 p. 100) pesés à l'état frais et émulsionnés dans l'eau salée physiologique.

Trois de ces animaux (I, II et III) vaccinés avec 20 milligr. sont éprouvés, après trente-cinq jours, par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 01 de tuberculose bovine virulente (origine Vallée, de notre laboratoire).

Deux autres (IV et V) de la même série, également vaccinés avec 20 milligr., sont éprouvés seulement après soixante-dix jours par la même dose de culture virulente.

Les six derniers lapins, tous vaccinés avec 30 milligr., sont divisés en deux lots : les trois premiers (V, VI et VII) sont éprouvés après trente-cinq jours ; les trois du second après soixante-dix jours, avec la même dose de la même

culture bovine virulente qui est simultanément inoculée à deux lapins témoins par voie veineuse.

Les témoins sont morts respectivement le cinquante-huitième et le soixante-quinzième jour, avec des lésions de tuberculose généralisée.

Le n° I, après cent soixante-dix-sept jours de survie, succombe brusquement le 20 mai 1922 de broncho-pneumonie à pasteurella. Aucun de ses organes ne présente la moindre lésion tuberculeuse.

Le n° II meurt, lui aussi, de pasteurellose après quatre-vingt-onze jours, sans aucune lésion bacillaire.

Le n° III est en parfait état de santé à la date du 20 juillet 1922.

Le n° IV, sacrifié après cent vingt-huit jours parce qu'il était atteint de paralysie du train postérieur, avait ses organes viscéraux sains, mais ses poumons contenaient quelques petits nodules fibreux bacillifères.

Le n° V est en bon état de santé le 1^{er} août 1922.

Le n° VI survécut cent vingt-quatre jours. Il présentait quelques lésions de tuberculose aux poumons. Foie et rate indemnes. Il a succombé à la pasteurellose.

Le n° VII, mort après cent quatre-vingt-quinze jours, également de pasteurellose, avait lui aussi quelques petits tubercules récents sur les deux poumons. Rien au foie ni à la rate.

Le n° VIII est en excellent état de santé le 1^{er} août 1922.

Le n° IX, mort après cent trente-six jours, n'a que quelques lésions discrètes de tuberculose pulmonaire; son foie et sa rate sont indemnes.

Le n° X, après avoir donné une portée de cinq petits bien portants, le 6 juin, succombe le 21 juillet à une infection pseudo-pneumococcique (maladie du nez). Ses organes splanchniques sont indemnes de toute lésion tuberculeuse. Ses poumons contiennent quelques nodules dans lesquels on trouve de rares bacilles.

Le n° XI reste en très bonne santé le 1^{er} août 1922, soit plus de sept mois après l'épreuve virulente.

Il est donc évident que l'inoculation intraveineuse de 20 milligrammes et, mieux encore, de 30 milligrammes de bacilles biliés protège le lapin contre une infection tuberculeuse mortelle en cinquante à soixante-quinze jours pour les témoins. Toutefois, cette protection ne s'exerce efficacement que chez les animaux sains. Elle disparaît chez les lapins touchés par l'épizootie de pasteurellose dont nous avons gravement souffert dans nos cages de laboratoire.

D'autres expériences, effectuées dans les mêmes conditions, nous ont permis de constater que les bacilles biliés injectés dans la circulation sanguine se retrouvent plus ou moins nombreux dans tous les organes viscéraux, surtout dans la rate, le foie et les poumons, pendant dix à vingt jours après l'inoculation. Ils sont moins abondants dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. Nous n'avons pas pu les déceler dans le rein.

A partir du vingtième jour on ne les trouve plus dans le foie ni dans la moelle osseuse. Ils se raréfient peu à peu dans les autres organes jusqu'à la fin du deuxième mois. Après ce délai, il devient impossible de les découvrir dans les frottis. Mais l'épreuve tuberculinique reste encore positive à la fin du quatrième mois.

Nous avons cherché à suivre la production des anticorps dans le sang d'un lapin, inoculé le 20 janvier 1922 avec 50 milligrammes de bacilles biliés dans la veine marginale de l'oreille. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Le 2 février, soit après 13 jours, le sérum de ce lapin contenait, par centimètre cube	5 unités d'anticorps.
Le 13 février, soit après 24 jours.	200 —
Le 1 ^{er} mars, — 39 —	300 —
Le 15 mars, — 34 —	100 —
Le 6 avril, — 76 —	20 —
Le 23 avril, — 93 —	0 —

La proportion d'anticorps s'accroît donc pendant environ trois mois après l'injection massive de bacilles biliés, puis elle décroît rapidement. Il ne semble cependant pas que ces variations quantitatives correspondent à une diminution de la résistance vis-à-vis de l'épreuve virulente, car les lapins se comportent de la même manière si l'épreuve est faite seulement trois mois, au lieu d'un mois après l'injection vaccinale.

La disparition des anticorps n'indique pas non plus que tous les bacilles biliés ont été résorbés ou éliminés par les voies naturelles d'excrétion (foie et intestin principalement), car si l'on pratique une injection intraveineuse de 0 c. c. 04 de tuberculine brute dans les veines du lapin, alors que la réaction de fixation est devenue négative, l'animal présente l'hyperthermie caractéristique et, les jours suivants, son sérum renferme de nouveau, et cela pendant près d'un mois, jusqu'à cent unités d'anticorps.

Ceux-ci disparaissent ensuite graduellement.

Dans nos expériences, l'injection intraveineuse de 20 à 30 milligrammes de bacilles biliés s'est montrée seule capable de conférer au lapin une résistance manifeste à l'infection virulente d'épreuve réalisée par voie intraveineuse avec la dose énorme de 0 milligr. 01 de bacilles bovins.

Les inoculations sous-cutanées de 2 milligrammes de ces mêmes bacilles biliés, répétées jusqu'à dix fois, tous les deux jours, ne parvenaient pas à produire le même résultat.

II. — Essais de vaccination du cobaye.

Nous avons éprouvé de grandes difficultés à conserver pendant un temps suffisamment long les nombreux cobayes sur lesquels devaient porter nos expériences. Beaucoup d'entre eux, malgré toutes les précautions prises, se sont trouvés contaminés dans les parcs par de la tuberculose zoogléique de Malassez et Vignal. D'autres ont succombé au cours du premier mois après l'inoculation vaccinale à une épizootie de pasteurellose, sans avoir subi l'infection virulente d'épreuve. Toutefois, 181 cobayes du poids moyen de 350 à 400 grammes, qui ont tous, sauf les témoins, préventivement reçu des doses variables de bacilles biliés, ont pu être utilisés.

Ils ont été répartis en six lots :

1°	Injectés par voie intracardiaque	25 cobayes.
2°	— — — et sous-cutanée	25 —
3°	— — — et intrapéritonéale	20 —
4°	— intrapéritonéale	11 —
5°	— sous-cutanée	68 —
6°	Infection par instillation oculaire	5 —

27 cobayes ont été utilisés comme témoins.

Chacun de ces lots a été divisé pour que les cobayes subissent à des temps variables l'infection d'épreuve.

Celle-ci a été réalisée le plus souvent par la méthode d'instillation oculaire dont les résultats sont d'une remarquable constance et qui correspond le mieux aux conditions de l'infection naturelle. Le dépôt sur la conjonctive d'une goutte d'émulsion de tuberculose bovine virulente, titrée à raison de 10 milligrammes par centimètre cube, ne produit aucune lésion locale et détermine, avec une régularité parfaite, une infection tuberculeuse progressive qui débute par les ganglions sous-maxillaires et cervicaux, s'étend aux organes thoraciques et abdominaux et entraîne la mort dans un délai de cinquante à soixante-quinze jours.

Exceptionnellement, pour quelques cobayes, nous avons

injecté les bacilles d'épreuve sous la peau de la cuisse à la dose de 0 milligr. 01.

Nous résumons ci-après les indications qui se dégagent de tous ces essais :

La voie *intracardiaque* est la seule qui, jusqu'à présent, nous ait fourni des résultats nettement favorables. La dose optimum de bacilles biliés est de 2 à 5 milligrammes en injection *unique*. 1 milligramme est insuffisant.

L'épreuve d'infection virulente par instillation oculaire, faite après cinquante-quatre jours, n'a produit qu'une infection restée localisée pendant trois à cinq mois dans les premiers groupes ganglionnaires. Après ce délai, l'évolution de la tuberculose se poursuit et la protection conférée par les bacilles biliés cesse. Pourtant, sur 21 cobayes ainsi vaccinés, nous n'avons observé qu'une seule tuberculose généralisée six mois et demi après l'épreuve.

La répétition des injections intracardiaques, à trois ou quatre semaines d'intervalle, est mal supportée; elle provoque fréquemment la mort des cobayes, soit immédiatement, soit dans les quarante-huit heures. Ceux qui ont résisté ont fait, après l'épreuve virulente, une adénite locale qui a persisté pendant quatre mois sans que l'infection s'étende aux autres organes.

Nous n'avons trouvé aucun avantage à associer à l'injection intracardiaque initiale une ou plusieurs injections successives sous-cutanées ou intrapéritonéales de bacilles biliés, aux doses de 1 à 2 milligrammes.

Les injections intrapéritonéales se sont montrées inefficaces. Il en est de même de la voie sous-cutanée, par injection unique de 5 ou 10 milligrammes, ou par doses de 2 milligrammes répétées deux ou trois fois.

Par contre, les injections répétées *dix fois tous les deux jours*, à des doses de 2 milligrammes, fournissent des résultats intéressants. Les cobayes ainsi traités et éprouvés par instillation oculaire, de trente-cinq à quarante-huit jours après la dernière injection vaccinale, n'ont présenté qu'une adénite cervicale, sans que l'infection tuberculeuse s'étendit aux autres organes avant la fin du quatrième mois après l'épreuve. Au niveau de chaque inoculation de bacille bilié il se formait de petits abcès froids dans le pus desquels on pouvait retrouver des bacilles

granuleux, complètement dépourvus de virulence pour les animaux neufs.

Les quelques essais de vaccination locale par instillations oculaires, répétées huit fois de deux en deux heures, de 0 milligr. 5 de bacilles biliés pour chaque dose, n'ont fourni que des insuccès. Tous nos animaux ont succombé à l'épreuve d'infection virulente, faite également par instillation oculaire, dans les mêmes délais que les témoins. Pourtant nous avons constaté que les bacilles biliés étaient très bien absorbés, car nous pouvions les retrouver encore dans les ganglions cervicaux trois et quatre semaines après les instillations.

CONCLUSIONS

Les résultats expérimentaux qui précèdent permettent de conclure que nos bacilles biliés, avirulents et non tuberculigènes peuvent, lorsqu'ils sont introduits préventivement à doses convenables, dans la circulation sanguine du lapin et du cobaye, conférer à ces animaux une résistance manifeste, mais seulement *temporaire*, aux infections virulentes d'épreuve rapidement mortelles pour les témoins.

Cette immunité artificielle fléchit peu à peu. Elle paraît cesser, chez le lapin, à partir du sixième mois, et, chez le cobaye, aux environs du cinquième mois après l'inoculation vaccinale. Elle disparaît aussitôt que les bacilles biliés sont entièrement éliminés ou résorbés et que les animaux ont perdu l'aptitude à réagir à la tuberculine.

Il semble donc que, chez le lapin et le cobaye, l'immunité acquise à l'égard de l'infection bacillaire soit peu durable. On pourra peut-être la prolonger en renouvelant périodiquement l'imprégnation vaccinale des organes lymphatiques. D'autres expériences sont nécessaires pour élucider cette question.

L'ANAPHYLAXIE ET L'IMMUNITÉ

par S. METALNIKOV.

Malgré le grand nombre de travaux consacrés à la solution de la nature de l'anaphylaxie, ce problème est encore loin d'être résolu.

La plupart des savants travaillant dans ce domaine considèrent surtout dans l'anaphylaxie le choc causant une mort soudaine qui survient immédiatement après une seconde introduction d'un antigène dans le sang d'un animal. Considérant ce choc comme un des caractères les plus typiques de l'anaphylaxie, beaucoup d'auteurs cherchent surtout à élucider les causes mêmes et la nature de ce choc.

Cependant ce choc ne constitue aucunement le point essentiel de l'anaphylaxie pas plus que les symptômes qui d'ordinaire l'accompagnent. Le trait le plus caractéristique de l'anaphylaxie est l'hypersensibilité, qui se manifeste régulièrement après l'introduction d'un antigène même en dose minime. Il est caractéristique ensuite que cette hypersensibilité se produit non seulement vis-à-vis des substances nuisibles, mais même vis-à-vis des substances albuminoïdes paraissant les plus inoffensives, comme, par exemple, le blanc d'œuf, le lait ou le sérum. Un autre point caractéristique à noter est que cette hypersensibilité survient après une période de dix à quatorze jours, c'est-à-dire à un moment où l'organisme acquiert l'immunité vis-à-vis de tel autre antigène.

Tous ces faits sont jusqu'à un certain point en contradiction avec nos idées sur l'immunité. On aurait pu, en effet, s'attendre à ce que l'immunisation, c'est-à-dire l'introduction dans un organisme de quelque agent virulent ou toxique, provoque une adaptation de la part de l'organisme, qui deviendrait moins sensible vis-à-vis de doses croissantes de ces agents virulents et toxiques.

La question se pose de savoir : comment concilier ces idées sur l'immunité avec l'anaphylaxie, c'est-à-dire avec ce fait que

l'organisme devient beaucoup plus sensible vis-à-vis d'un antigène après l'introduction de doses minimales de celles-ci?

Cette contradiction entre l'anaphylaxie et l'immunité constitue, à notre avis, le problème principal et fondamental dont la solution au moyen de recherches expérimentales est à l'ordre du jour.

Durant les dix dernières années, de nombreux travaux et traités entiers consacrés aux différentes questions ayant rapport à l'anaphylaxie ont été publiés. Les divers phénomènes de l'anaphylaxie furent reproduits et étudiés non seulement sur le lapin et le cobaye, mais aussi sur beaucoup d'autres animaux. Dernièrement les phénomènes de l'anaphylaxie ont été décrits par A. Lumière et H. Couturier (1) qui les constatèrent même chez les plantes, c'est-à-dire dans des organismes dépourvus de sang et de nerfs. Les mêmes symptômes d'hypersensibilité peuvent être observés sur certains microbes, comme le prouvent les travaux de Ch. Richet, Bochrach et Cardot (2). Tout ceci montre que l'anaphylaxie est un phénomène très répandu dans la nature, et qui présente une importance considérable au point de vue de la biologie générale.

C'est pourquoi il est nécessaire, pour comprendre et mettre à jour le problème de l'anaphylaxie, de diriger l'étude non seulement sur les animaux supérieurs avec leur système de circulation complexe et leurs organes si divers, mais aussi sur les invertébrés et les plantes avec leur organisation plus simple. Aussi est-il nécessaire de baser le problème de l'anaphylaxie sur un fondement d'ordre biologique général.

Les susdites considérations m'ont amené à entreprendre une série d'expériences sur différents animaux invertébrés.

Mes expériences ont porté en première ligne sur la chenille de la mite des abeilles (*Galleria melonella*).

De petites doses de sérum de cheval dilué furent introduites dans la cavité coelomique de jeunes chenilles de *Galleria melonella*. Après douze à quatorze jours ces mêmes chenilles reçurent l'injection de sérum de cheval en doses et concentration variées. Je ne pus cependant constater aucun symptôme

(1) C. R. Acad. Sc., 1921, p. 1313.

(2) C. R. Acad. Sc., 1921, pp. 512 et 1554.

d'hypersensibilité. Même en injectant des doses énormes de sérum de cheval dans la cavité coelomique des chenilles, ces dernières ne manifestent aucun des symptômes de l'anaphylaxie. J'ai procédé à la même expérience en me servant d'autres sérums, toujours sans obtenir de résultats perceptibles. Cependant, étant complètement insensible vis-à-vis du sang d'autres animaux, les chenilles de la mite des abeilles manifestèrent une sensibilité extraordinaire vis-à-vis de leur propre sang. Il suffit, en effet, de prélever, au moyen d'un tube effilé, une petite goutte de sang à une de ces chenilles et d'injecter ensuite ce sang à cette même chenille ou à une autre de la même espèce, pour obtenir une sorte de choc anaphylactique. L'animal manifeste une forte excitation, se meut dans tous les sens, son corps se contracte convulsivement, l'extrémité postérieure du corps est relevée; au bout de deux à trois minutes l'animal tombe sur le côté ou se renverse sur le dos et meurt, si la dose du sang injecté est assez grande, et le sang a subi une oxydation considérable. Plus le sang de la chenille reste exposé à l'action de l'air, plus il devient toxique. Par contre, si la dose a été faible et le sang n'a pas été suffisamment oxydé, les chenilles se réveillent après une à deux heures d'état comateux et se remettent complètement. Ces phénomènes rappellent par leur aspect extérieur le choc anaphylactique, mais il est clair qu'ils n'ont rien de commun avec ce dernier, surtout vu l'absence d'une immunisation préalable, c'est-à-dire d'une injection préalable d'antigène.

Des expériences ultérieures ont démontré que la mort soudaine des chenilles serait due probablement à l'action coagulatrice du sang oxydé, action qui produit la formation de coagulums entravant la circulation du sang (1).

Des expériences analogues ont été faites avec une autre chenille (*Cnethocampa pityocampa*). Là les symptômes de choc après injection du sang de l'animal se produisent d'une façon encore plus accentuée que chez la *Galleria melonella*.

Toutefois j'ai pu observer, chez cette dernière également, les phénomènes typiques de supersensibilité et d'anaphylaxie.

(1) Le sang des chenilles ne coagule qu'à la surface étant mis en contact avec l'oxygène de l'air.

C'est en immunisant les chenilles contre des vibrions de choléra très peu virulents que j'ai obtenu pour la première fois ces phénomènes. Comme j'ai eu l'occasion de le signaler dans un article précédent, les chenilles se laissent très facilement et rapidement immuniser contre le choléra. Après quelques heures, elles supportent facilement les doses minimales mortelles. Mais, tout en supportant facilement les doses minimales mortelles, elles deviennent beaucoup plus sensibles vis-à-vis des fortes doses, en comparaison avec les chenilles normales.

Voici quelques expériences :

EXPÉRIENCE 436. — On coupe une patte à la chenille de *Cnethocampa pityocampa*. En la pressant légèrement, on obtient plusieurs gouttes de sang, qu'on ramasse dans un tube effilé. Deux minutes après on injecte le sang à la même chenille ou à une autre. (Chaque chenille reçoit de 1/10 à 1/20 de centimètre cube du sang.) Aussitôt après l'injection les chenilles manifestent une forte excitation, se contractent convulsivement et meurent en quelques minutes.

Le même sang injecté aux chenilles de *Galleria mellonella* ne provoque aucun phénomène morbide chez ces derniers.

EXPÉRIENCE 437. — Par la méthode analogue on prélève plusieurs gouttes de sang chez les chenilles du *Galleria mellonella*. On laisse ce sang dans un verre à montre 3-5 minutes en contact avec l'oxygène de l'air. Ce sang oxygéné est injecté aux 5 chenilles de *Galleria mellonella*; 2-3 minutes après l'injection, le choc typique et la mort de 3 chenilles. Les deux autres se réveillent après 1-2 heures d'état comateux et se remettent complètement.

Le même sang injecté aux 5 chenilles de *Cnethocampa pityocampa* provoque un choc typique et la mort de toutes les chenilles injectées.

EXPÉRIENCE 339. — 10 chenilles reçoivent dans la cavité générale 1/80 de centimètre cube des vibrions cholériques chauffés à 58°.

I. — Le lendemain 5 chenilles immunisées sont injectées par une dose minima mortelle de vibrions vivants. Après 24-48 heures toutes les chenilles sont bien portantes et vivantes.

5 chenilles normales de contrôle injectées par la même dose de vibrions vivants sont mortes en 15-24 heures.

II. — 5 autres chenilles immunisées sont injectées par une dose très forte des vibrions vivants (1/40 de centimètre cube d'une émulsion épaisse de vibron cholérique de vingt-quatre heures sur gélose).

10-15 minutes après l'injection toutes les chenilles sont très malades; 2-3 heures après, elles meurent. 5 chenilles normales de contrôle sont injectées par la même dose des vibrions vivants. 2-3 heures après l'injection elles sont encore bien portantes et vivantes. Elles ne meurent que 8-10 heures après l'injection.

EXPÉRIENCE 400. — 4 chenilles reçurent deux fois une faible dose de vibrions cholériques chauffés à 58°.

Cinq jours après les mêmes chenilles sont injectées par une dose très forte de vibrions vivants. 2-3 minutes après l'injection 3 chenilles meurent. La quatrième chenille meurt une heure après; 5 chenilles normales de contrôle, injectées par la même dose, meurent en 6-10 heures.

EXPÉRIENCE 402. — 5 chenilles reçurent deux fois une faible dose de vibrions cholériques chauffés à 58°.

Deux jours après les mêmes chenilles sont injectées par une dose très forte de vibrions cholériques. 2-3 minutes après l'injection 2 chenilles meurent subitement. Les trois autres meurent en 1-2 heures après l'injection. 5 chenilles de contrôle meurent en 6-12 heures.

Nous avons souvent répété ces expériences. Dans tous les cas, les chenilles immunisées qui supportaient très bien des doses sûrement mortelles de choléra virulent étaient plus sensibles que les chenilles normales, non immunisées aux doses fortes du même virus.

Nous avons à plusieurs reprises observé un phénomène très curieux qui ressemblait beaucoup au choc anaphylactique des animaux supérieurs. Les chenilles immunisées, injectées avec une forte dose d'une émulsion de vibrions cholériques, mouraient en 2-3 minutes (expériences 400 et 402). Malheureusement cette expérience ne réussit pas toujours pour des raisons que nous n'avons pas encore pu saisir. Les chenilles immunisées sont très bien préservées contre les petites doses de virus qui peuvent pénétrer dans le corps pendant l'infection naturelle. Mais cette immunité ne les préserve pas contre l'introduction brusque d'une grande quantité de vibrions dans la cavité générale. Au contraire, ces mêmes forces, qui lui assurent l'immunité dans la lutte contre les microbes, provoquent la mort très rapide de la chenille (1).

Ainsi selon la valeur de la dose de microbes nous obtenons chez le même animal, ou les phénomènes de l'immunité (doses faibles) ou ceux de l'anaphylaxie (doses fortes).

Nous trouvons des phénomènes analogues chez les animaux supérieurs.

Ce fait est bien connu que les cobayes se laissent facilement immuniser contre le choléra au moyen d'injections sous-cutanées du vaccin.

(1) *C. R. Acad. Sc.*, 1921.

Si on injecte à un cobaye immunisé une dose faible de vibrions cholériques, il la supporte très bien. Au contraire, ce même cobaye, injecté avec une forte dose dans les veines ou dans le péritoine, meurt très vite, souvent subitement, tandis que le cobaye normal, non immunisé, injecté par la même dose, n'en meurt qu'après une assez longue période.

Delanoé a étudié l'anaphylaxie typhique, et il a constaté qu'elle coïncide avec l'immunité. « Suivant la dose de l'injection déchainante on observe tantôt de l'immunité (avec des doses faibles), tantôt de l'anaphylaxie (avec des doses fortes) » (1).

D'après Koch et Wassermann on observe le même phénomène dans la tuberculose.

Si l'on injecte des bacilles tuberculeux pour la seconde fois, sous la peau, ils donnent une réaction beaucoup plus rapide et moins intense qui ne produit pas de chancre et se guérit assez vite. On a pu démontrer que tout dépend de la quantité des doses injectées. Si on dépasse ces doses, et surtout si les bacilles tuberculeux sont injectés dans les veines ou dans le péritoine, ils provoquent une mort très rapide, tandis que les cobayes normaux supportent très bien les mêmes doses (2).

J'ai fait des expériences analogues avec les bacilles tuberculeux pisciaires. Les cobayes normaux supportent des doses énormes de ces bacilles, injectées dans le péritoine. Mais si un cobaye préalablement immunisé reçoit ensuite une dose forte de bacilles pisciaires dans le péritoine, il meurt très vite d'une inflammation générale du péritoine.

C'est donc un fait général: un animal immunisé, qui résiste très bien à des doses minimales mortelles d'un antigène quelconque, est beaucoup plus sensible à des doses fortes du même antigène que l'animal normal non immunisé.

Quelle est la cause de ce phénomène paradoxal?

Nous supposons qu'elle est dans la sensibilité des cellules. L'introduction d'un antigène dans l'organisme a pour résultat une augmentation de la sensibilité des cellules avec ce même antigène. Les cellules deviennent hypersensibilisées, c'est-à-dire qu'elles commencent à réagir beaucoup plus énergi-

(1) CH. RICHET, p. 135.

(2) A. WASSERMANN, Immunität bei Tuberculose. *Zeil. f. Tub.*, 1921.

quement, plus fortement qu'auparavant envers ce même antigène.

C'est cette hypersensibilité des cellules qui est la cause de l'immunité (si la dose de l'antigène est faible) et de l'anaphylaxie (si la dose est forte). Injecté dans les veines ou des cavités du corps, l'antigène provoque les réactions brusques des cellules, des réactions inflammatoires, généralisées et des chocs. Pour prouver cette hypothèse, nous avons entrepris une série d'expériences sur la sensibilité et la chimiotaxie des cellules, surtout des cellules libres (phagocytes et leucocytes).

Plusieurs cobayes et lapins ont été injectés 2-3 fois par différents antigènes (blanc d'œuf, lait, microbes). Trois, quatre semaines après la dernière injection, nous avons introduit dans le péritoine ou sous la peau de l'animal immunisé plusieurs petits tubes capillaires remplis de l'antigène correspondant et, comme contrôle, des tubes avec des liquides neutres qui ne provoquent pas la chimiotaxie positive des leucocytes. Après 10-24 heures, on enlevait les tubes capillaires et on les examinait au microscope. Tandis que dans les tubes témoins remplis de liquides neutres, il y a très peu de leucocytes, les tubes remplis d'antigène sont ordinairement bourrés de leucocytes. L'antigène, dilué 10-100 fois par l'eau physiologique, attirait très bien les leucocytes des animaux immunisés.

Toutes ces expériences réussissent mieux si les tubes capillaires sont introduits, non sous la peau, comme on le faisait ordinairement, mais dans la cavité générale. Cette opération est beaucoup plus difficile, mais elle donne des résultats plus sûrs (1). Les expériences démontrent que chez un animal immunisé et anaphylactisé, les leucocytes et toutes les cellules mobiles sont toujours beaucoup plus sensibles vis-à-vis d'un antigène donné, que chez un animal normal non immunisé.

Le fait que l'immunisation provoque toujours une sensibili-

(1) Les tubes capillaires attachés sur des petites ficelles étaient introduites dans la cavité générale par un trocart. 8-12 heures après, on les enlève facilement, sans ouvrir la cavité générale de l'animal.

Je donnerai les détails de cette méthode dans un mémoire sur la chimiotaxie des leucocytes.

sation des globules blancs est bien prouvé aussi par le phénomène de l'anaphylaxie locale (phénomène d'Arthus).

Le fait est bien connu. Si on introduit sous la peau d'un lapin un peu de blanc d'œuf ou d'un autre antigène, la réaction locale est très faible. La seconde injection produit une réaction plus forte. Les 3-5 injections attirent une énorme quantité des globules blancs et provoquent la formation des grandes suppurations et abcès.

Les expériences de Grineff (1) et Manoukhine (2) ont démontré qu'on peut empêcher l'anaphylaxie locale en injectant la veille dans la veine une petite dose de l'antigène correspondant. C'est le phénomène bien connu de l'antianaphylaxie, étudié, pour la première fois, par Besredka.

Nous avons fait les mêmes expériences avec des tubes capillaires. Un lapin sensibilisé reçoit dans la veine plusieurs petites doses de l'antigène. Le lendemain on introduit dans la cavité générale du même lapin les tubes capillaires remplis avec l'antigène dilué. 8-10 heures après on enlève les tubes qui contiennent très peu de leucocytes.

Tout prouve que les globules blancs ont perdu leur sensibilité envers l'antigène donné. Quelle en est la cause?

Pour comprendre ces résultats, il faut s'adresser aux travaux classiques de Pfeffer sur la chimiotaxie des anthérozoïdes des fougères. Ces anthérozoïdes ont une chimiotaxie positive très nette pour l'acide malique en solution faible. Si on remplit les tubes avec cet acide et si on les introduit dans l'émulsion des anthérozoïdes vivants, ces derniers, attirés par l'acide malique, entrent dans les tubes en grande quantité. Si, au contraire, comme l'a démontré Pfeffer, on ajoute une petite dose de l'acide dans l'émulsion qui renferme les anthérozoïdes, ceux-ci ne sont plus attirés par les faibles doses d'acide malique qui sont dans les tubes. C'est ainsi que les petites doses d'antigène injectées aux animaux anaphylactisés rendent les cellules moins sensibles aux doses qui les excitaient et les attiraient auparavant. La condition nécessaire pour que la sensibilité puisse se conserver et se manifester, est l'absence de l'anti-

(1) GRINEFF. *C. R. Soc. Biol.*, 72, p. 979.

(2) MANOUKHINE et POTIRALOWSKY. *C. R. Soc. Biol.*, 73, p. 219.

gène dans les humeurs (1). Le contact prolongé des cellules avec l'antigène les accoutume, les rend moins sensibles à l'action de l'antigène et empêche la manifestation de l'anaphylaxie. On peut dire que toutes les causes qui diminuent la sensibilité de la cellule ont la faculté de produire l'antianaphylaxie.

Le travail bien connu de Roux et Besredka sur l'action des narcotiques chez les animaux anaphylactisés confirme pleinement notre hypothèse.

Les narcotiques et différents poisons du système nerveux, qui diminuent la sensibilité des cellules, suppriment les phénomènes de l'anaphylaxie. D'après l'expérience mémorable de Roux et Besredka, l'éther, le chloral, etc., sont des antianaphylactiques.

Ils n'empêchent l'anaphylaxie qu'en paralysant les réactions des cellules. Mais ils empêchent aussi l'immunité, car ils diminuent la sensibilité et la résistance des phagocytes et des autres cellules qui prennent part à la défense de l'organisme contre les microbes et leurs toxines.

C'est ainsi qu'on peut dire qu'à la base de tous les phénomènes d'immunité et d'anaphylaxie se trouve la sensibilité des cellules. C'est grâce à cette sensibilité que les phagocytes sont attirés vers les microbes, les englobent et les digèrent; grâce à cette sensibilité que les cellules sécrètent les différentes substances nuisibles pour les microbes; grâce à cette sensibilité que se produisent des inflammations et des phénomènes d'anaphylaxie locale et générale.

Le fait fondamental de l'anaphylaxie et de l'immunisation c'est que, par une substance albuminoïde hétérogène, les cellules de l'organisme se sont modifiées de telle sorte, qu'elles vont réagir alors avec plus d'intensité à l'injection de cet antigène. Les cellules sont devenues sensibles, c'est-à-dire immunisées ou anaphylactisées.

Une fois qu'elles sont sensibilisées, elles ont pour très longtemps (un an, deux ans, peut-être plus encore) acquis cette propriété (Charles Richet).

(1) Ces faits expliquent pourquoi la sensibilisation des animaux se produit plus vite si on injecte de petites doses, car les petites doses sont plus vite résorbées et éliminées.

Mais ce ne sont pas seulement les phagocytes qui sont devenus sensibles envers un antigène donné, mais toutes les cellules de l'organisme. Dans l'immunité comme dans l'anaphylaxie nous avons un complexe des réactions ou des réflexes des différentes cellules.

En étudiant le mécanisme de l'immunité chez les chenilles (1) nous avons pu observer que l'introduction d'un antigène quelconque provoque une réaction très énergique des phagocytes et de toutes les autres cellules : lymphocytes, protoleucocytes, cellules sphéruleuses, etc.

Chez une chenille immunisée, la phagocytose, la digestion des microbes englobés, la bactériolyse et toutes les autres réactions des cellules se passent beaucoup plus rapidement que chez une chenille normale.

Et cette accélération des réactions a lieu non seulement après l'injection des microbes et de leurs toxines, mais aussi des substances neutres, peu toxiques, comme carmin, blanc d'œuf, lait, etc. Chaque organisme vivant constitue un système harmonique qui se régularise par lui-même.

Infraction minime de ce système par l'introduction d'une substance étrangère, provoque une réaction de toutes parties du système, de toutes cellules de l'organisme.

« Or, quoiqu'il ne puisse être ici question que d'hypothèses, on peut admettre que la défense de l'organisme n'est pas seulement une défense des individus, mais encore une défense de l'espèce. Il ne s'agit pas seulement pour chaque individu de maintenir son existence, il faut encore que ces individus restent semblables à eux-mêmes.

« Si des substances hétérogènes pouvaient impunément pénétrer dans l'organisme et modifier ses propriétés chimiques fondamentales, pénétrant dans le protoplasme pour en altérer la nature, alors qu'est-ce qu'il en serait fait de la constitution somatique de chaque espèce animale, fait d'une lente et ancestrale acquisition.

« Il faut que l'être soit stable, et c'est pour le maintien de cette stabilité qu'il réagit avec tant d'énergie aux atteintes chimiques qui peuvent l'affecter. Pour l'état optimum du

(1) *Ces Annales*, 1922.

cobaye, il ne faut pas que les sérums de lapin et de chien puissent remplacer son sérum de cobaye, et alors il y a violente réforme réactionnelle, quand, pour la seconde fois, par une tentative d'effraction et une voie anormale son individualité chimique de cobaye est menacée. » (Ch. Richet.)

De ce point de vue on ne peut pas expliquer l'immunité et l'anaphylaxie par l'action séparée de telle ou telle substance, de telle ou telle cellule. L'immunité est le résultat des efforts combinés de toutes les cellules de l'organisme.

Les travaux remarquables de W. Schultz, Dale et autres sur les organes isolés le démontrent avec certitude.

W. Schultz (1) est le premier qui ait appliqué les méthodes des organes isolés pour l'étude de l'anaphylaxie. Il prenait des organes d'animaux immunisés et les plaçait suspendus dans du sérum artificiel. L'addition au bain de minimes quantités d'antigènes provoque une réaction très forte des organes sensibilisés, tandis que les organes des animaux normaux, non immunisés réagissent très peu, presque pas.

Dale (2) fit des recherches analogues sur l'utérus du cobaye entièrement isolé du corps.

L'utérus du sujet anaphylactisé, isolé et débarrassé de toute trace de sang ou de sérum, se contracte violemment au contact d'une faible quantité d'antigène. Tandis que l'utérus sensibilisé se contracte après l'addition au bain de 0,025 et même de 0,0025 cent. cubes d'antigène (sérum de cheval) l'utérus normal ne réagit pas même à 1 cent. cube de cet antigène.

Le muscle utérin provenant d'un animal immunisé vis-à-vis de plusieurs antigènes, irrigué successivement par chacun d'eux, donne lieu chaque fois à une contraction caractéristique.

Vu que la sensibilisation de l'utérus commence et se développe parallèlement avec l'apparition des caractères de l'anaphylaxie, Dale l'envisage comme un symptôme d'anaphylaxie locale et l'interprète comme l'expression d'une propriété musculaire qui manifeste son action en dehors de la collaboration du sang.

(1) W. SCHULTZ. *Journ. Pharm. and Exp. Ther.*, 1910.

(2) DALE. *Journ. Pharm. and Exp. Ther. Ibid.*, 1912-1913.

Les mêmes expériences ont été faites par A. Cesaris Demel (1) et Launoy (2).

Ils ont étudié les réactions du cœur isolé du lapin ou du cobaye sensibilisé par le sérum de veau ou de cheval, le lait ou l'albumine d'œuf, quand il est irrigué au moyen du liquide de Locké, accompagné d'antigène. Le cœur de cobaye sensibilisé vis-à-vis du sérum de cheval s'affaiblit et ne bat plus qu'avec lenteur, quand on introduit dans ce liquide un peu de sérum de cheval.

En somme, le cœur serait sensibilisé comme le sont l'intestin et l'utérus et comme c'est le mésentère chez les grenouilles étudiées par Fröhlich. Et cette sensibilité est propre aux cellules et ne dépend pas des humeurs et du sang, comme l'ont bien démontré Coca, Fenyvessy, Freund et autres.

Coca prenait des animaux sensibilisés (activement et passivement) et remplaçait leur propre sang par le sang défibriné d'un animal normal. Ainsi il a réussi à éliminer l'action des humeurs et des anticorps. Cependant la sensibilité de cellules envers l'antigène donné se conservait complètement. Fenyvessy et Freund sont arrivés aux mêmes résultats en appliquant les mêmes méthodes. Quand l'animal est immunisé passivement, ses cellules fixent la sensibilisatrice et deviennent sensibilisées.

Le fait qu'il existe une période d'incubation dans l'anaphylaxie passive (4-6 heures) plaide en faveur de cette hypothèse.

CONCLUSION

Le fait fondamental que nous observons dans l'anaphylaxie et l'immunité est l'hypersensibilité des cellules. Les cellules de l'organisme injecté par une substance albuminoïde hétérogène ont été modifiées de telle sorte qu'elles vont réagir alors avec plus d'intensité à l'introduction de cet antigène.

On peut dire que, pendant l'immunisation, toutes les cellules se mobilisent contre les microbes ou l'antigène donné, comme

(1) A. CESARIS DEMEL. *Arch. Ital. de Biol.*, 1910.

(2) LAUNOY. *Ces Annales*, 1911.

si c'était un vrai ennemi. Si cet antigène ennemi réapparaît dans l'organisme, les phagocytes se précipitent avec une grande rapidité sur lui. Toutes les autres cellules réagissent aussi : les cellules phagocytaires fixes, les cellules des tissus conjonctifs, les vaisseaux, les nerfs, etc.

Il se produit une réaction inflammatoire, une suppuration, un abcès. Toutes ces réactions sont très utiles en elles-mêmes pour l'organisme, parce qu'elles empêchent la pénétration des microbes dans le sang et dans les cavités du corps. Plus les cellules sont sensibles, plus elles réagissent intensément pour la défense de l'organisme.

C'est un fait général dans le règne animal et végétal. Vaviloff, qui a fait un travail très intéressant sur l'immunité des plantes, écrit :

« Les cellules des plantes possèdent une sensibilité extrême envers les différents parasites; plus elle est marquée, plus se manifeste l'immunité de la plante. Souvent ces cellules sensibles se nécrosent très vite et sont rejetées au dehors (1). »

Dans les conditions normales le virus pénètre sous la peau ou sous la muqueuse en petite quantité et la réaction inflammatoire, qui se forme ici, protège très bien l'organisme. Tout autre est le résultat, si l'antigène est introduit directement dans les veines ou dans les cavités générales d'un animal immunisé, dont les cellules sont hypersensibilisées. Les réactions inflammatoires, qui sont utiles, quand elles occupent une superficie limitée, en se propageant dans les vaisseaux et les organes internes, peuvent provoquer des troubles et des chocs que nous observons ordinairement dans l'anaphylaxie.

On peut comparer tous ces phénomènes avec les brûlures. Quand la brûlure est petite, elle provoque des réactions inflammatoires qui sont douloureuses, mais pas dangereuses. Si, au contraire, la brûlure est forte et s'étend à une grande superficie, les réactions inflammatoires qu'elle provoque peuvent occasionner des troubles graves et des chocs morbides. Ainsi nous pouvons dire que l'anaphylaxie est le résultat des réactions rapides des cellules, sensibilisées par l'immunisation. Ces réactions se manifestent ou sous forme d'anaphylaxie locale,

(1) VAVILOFF, Immunité des plantes. *Thèse russe*, 1921.

quand l'antigène est introduit sous la peau, ou sous forme d'anaphylaxie générale, quand l'antigène est injecté dans les vaisseaux et les cavités du corps.

De ce point de vue, il n'y a aucune contradiction entre l'anaphylaxie et l'immunité, car les deux phénomènes sont occasionnés par la même cause, qui est l'hypersensibilité des cellules.

(Laboratoire du professeur Mesnil à l'Institut Pasteur.)

ÉTUDES SUR LE STREPTOCOQUE GOURMEUX

(PREMIER MÉMOIRE)

par MM. BROCCQ-ROUSSEU, FORGEOT et A. URBAIN.

Unicité du streptocoque gourmeux.

La solution du problème de l'unicité ou de la pluralité des streptocoques humains s'est posée depuis longtemps, car, ainsi que le dit Besredka, « de cette solution dépend l'orientation de la sérothérapie antistreptococcique » (1).

Les méthodes employées pour grouper les streptocoques humains ont été des plus variées : caractères morphologiques, origine, virulence, agglutination, action sur les sucres et différents milieux, fixation du complément, etc.

Ces méthodes ont permis de constituer des groupes qui ne concordent pas entre eux. On aboutit, comme le dit Burnet (2), « à un certain ordre ou rangement relatif, à tel ou tel caractère, non à une classification vraie ».

Le même problème s'est posé à nous, en ce qui concerne les streptocoques des animaux, et en particulier ceux du cheval.

Les recherches poursuivies avec les streptocoques des animaux n'ont pas l'ampleur de celles faites avec les streptocoques humains.

Nous avons analysé, au cours d'une étude d'ensemble (3), les différents travaux publiés sur ce sujet. Nous rappellerons seulement que dès 1895 Lignières a groupé un certain nombre de caractères biologiques qui lui semblaient suffisants pour différencier le streptocoque pyogène du streptocoque gourmeux. Il semble qu'il y ait surtout lieu de retenir les deux faits suivants : le streptocoque gourmeux est pathogène pour

(1) BESREDKA. *Bull. Inst. Pasteur*, 30 août 1904, p. 657.

(2) BURNET. *Bull. Inst. Pasteur*, 15 novembre 1918.

(3) BROCCQ-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN, Les streptocoques des animaux. *Revue de Pathol. comp.*, 20 mai 1921.

le poulain, alors que le streptocoque pyogène le laisse indemne; le sérum préparé avec le streptocoque pyogène est sans action sur le streptocoque gourmeux.

Marmorek avait constaté, en 1902, que l'ensemencement d'un filtrat de streptocoque pyogène avec le même streptocoque ou avec un streptocoque quelconque d'origine humaine ne donne pas de culture; tandis que l'ensemencement du même filtrat avec le streptocoque gourmeux donne une culture.

Nous n'avons donc pas, à l'heure actuelle, de signe certain pour différencier certains streptocoques.

Au cours des études que nous poursuivons sur les streptocoques des animaux, et en particulier sur celui de la gourme, nous avons été amenés à rechercher, en première ligne, un moyen de différenciation: nous avons repris l'idée émise par Besredka (1) sur la valeur de la fixation du complément comme moyen de classification des streptocoques, et nous avons utilisé aussi l'action de l'hémolysine spéciale, qu'il a appelée streptocolysine, sur divers globules.

A. — *Fixation du complément.*

Le problème à résoudre était le suivant: un streptocoque gourmeux correspond-il toujours à un anticorps spécifique? Cet anticorps n'est-il pas commun à ce streptocoque gourmeux, à d'autres streptocoques du cheval, aux différents streptocoques des autres animaux et de l'homme?

Nous avons utilisé, dans cette recherche, différentes souches de streptocoques que nous énumérerons plus loin, et aussi divers microbes à titre de contrôle.

Nous avons recherché, pour chacun d'eux, leur valeur antigène vis-à-vis d'un sérum très riche en anticorps, préparé à l'aide de streptocoques gourmeux tués par l'alcool-éther (2).

Comme antigène, nous avons pris, dans tous les cas, des streptocoques tués par l'alcool-éther, émulsionnés à raison de 1 centigramme pour 20 cent. cubes d'eau physiologique à 9 p. 1.000.

(1) BESREDKA. Ces *Annales*, 1904, p. 362. Médicaments microbiens, 1912, p. 280.

(2) BROcq-ROUSSEU, Injections au cheval de streptocoque équin, traité par l'alcool-éther. *C. R. Soc. de Biol.*, 1921, n° 9, p. 445.

L'émulsion, pour être très homogène, doit être faite de la façon suivante : on agite pendant quelques minutes le poids de microbes secs nécessaire, avec quelques centimètres cubes d'eau physiologique, dans un ballon en verre contenant des perles de verre de différentes grosseurs : on complète ensuite au volume voulu (1). On obtient ainsi une suspension microbienne d'aspect colloïdal.

Comme il faut environ 5 grammes de microbes frais pour avoir 1 gramme de microbes alcool-éther, l'émulsion utilisée est donc cinq fois plus riche en corps microbiens que l'antigène ordinairement employé, et qui est constitué par 1 centigramme de streptocoques pour 20 cent. cubes d'eau physiologique (2).

Toutes nos réactions de déviation, ainsi que les titrages, ont été faits suivant la technique de Calmette et Massol. Les résultats obtenus sont exprimés en unités d'alexine fixée, d'après le rapport $\frac{N}{V}$.

Examinons maintenant comment se comportent les différents streptocoques.

1° *Streptocoques équins de la gourme.*

Origine	Unités d'anticorps.
1. Dôle. (abcès sous-glossiens et parotidiens).	1.500
2. Orléans	—
3. Segala II	—
4. 376.	—
5. Carpano 50	—
6. Bec Hellouin 402	—
7. — 542	—
8. — 480	—
9. Bonnavois 692.	—
10. — 634.	—
11. — 705.	—
12. — 734.	—
13. — 714.	—
14. Montfaucon Macon	—
15. Sauter Macon	—
16. Macon 958.	—
17. Eclairer 1 ^{er} chasseurs.	—
18. Neurasthénie 1 ^{er} ch.	—

(1) A. URBAIN, Sensibilisatrice due à la bactériémie charbonneuse. *C. R. Soc. de Biol.*, 7 janvier 1922, p. 9.

(2) NICOLLE, FRASEY, DEBAINS et NICOLAS, Recherches sur la préparation des sérums antimicrobiens et antitoxiques chez le cheval. Ces *Annales*, mai 1920.

Origine.	Unités d'anticorps.
19. Anglars Juillac 1179 . . . (abcès sous-glossiens et parotidiens).	1.500
20. Bonnavois 671.	—
21. — 730.	—
22. Mignon	1.200
23. Ribaut Macon	1.200
24. Pleurésie (Passe-par-là).	30
25. Liquide céphalo-rachidien (Wilbert	1.500
26. Abcès du garrot (cours de gourme).	1.500
27. Sinusite (Bouchy).	1.200

Tous ces streptocoques gourmeux, sauf l'un d'eux, fixent donc le complément avec un taux considérable.

2° *Streptocoques équins non gourmeux.*

Origine.	Unités d'anticorps.
1. 12 ^e Dragons	0
2. 19 ^e Dragons	0
3. Alep	0
4. 238	0

Ces souches ont été isolées de pus de lymphangites épizootiques.

3° *Streptocoques humains.*

Origine.	Unités d'anticorps.
1. Pneumonie (Zœller).	0
2. — (Chauffart)	0
3. Otite (Boulleau)	0
4. Crachats (Bezangon)	0
5. Urine —	0
6. Pleurésie —	0
7. Sein —	0
8. Liquide céphalo-rachidien	0
9. Erysipèle.	0

4° *Streptocoques d'autres animaux.*

1. Mammite de la vache (Urbain)	0
2. — (Chrétien)	0
3. Poule (Chrétien).	0
4. Veau 1 —	0
5. — II —	0
6. Porc —	0
7. Lapin (Truche)	0
8. Chien (Verge).	0
9. Rat (Urbain)	0

5° *Microbes divers.*

Origine.	Unités d'anticorps.
1. Staphylocoque blanc équin.	0
2. — doré humain	0
3. Pneumocoque I	0
4. — II	0
5. — III.	0
6. <i>B. subtilis</i>	0
7. Bactéridie charbonneuse sporulée	0
8. — — asporogène.	0

De ces expériences il ressort très nettement que :

a) Tous les streptocoques gourmeux ont une valeur antigène très active pour la recherche des anticorps streptococciques des sérums antigourmeux ;

b) Tous les autres streptocoques humains ou animaux, de même que d'autres microbes, donnent une réaction de fixation négative, en présence des mêmes sérums.

En d'autres termes, la sensibilisatrice d'un sérum antistreptococcique gourmeux est spécifique ; elle ne correspond qu'au streptocoque de la gourme.

B. — *Action de l'hémolysine.*

Nous confirmons, par ce procédé, les notions courantes de différenciation entre les streptocoques humains et les équins ; et nous y ajoutons une démonstration nouvelle, que le streptocoque gourmeux est différent de tous les autres streptocoques du cheval étudiés, et aussi des streptocoques isolés des différents animaux.

En cultivant le streptocoque humain dans un milieu renfermant du sérum de lapin, Besredka a obtenu une hémolysine à laquelle il a donné le nom de streptocolysine. Nous avons recherché l'action, sur divers globules, du filtrat d'une culture de streptocoque de la gourme, et nous l'avons comparée à celle des filtrats de cultures d'autres streptocoques équins, humains, et de divers animaux, faites dans les mêmes conditions.

Nous avons utilisé la méthode de Besredka, en la simplifiant. Au lieu de partir du sang du cœur d'un lapin tué par une injection virulente de streptocoque, nous avonsensemencé du

sérum de lapin préalablement chauffé trente minutes à 55°, avec une culture de streptocoque en bouillon sérum, âgée de vingt-quatre heures.

Après vingt-quatre heures, cette culture en sérum de lapin, est filtrée sur une bougie Chamberland n° 3. Ainsi que le recommande Besredka, pour faciliter la filtration, nous avons dilué la culture avec un égal volume d'eau physiologique à 7,5 p. 1.000.

On recherche ensuite le pouvoir hémolytique du filtrat en le faisant agir à la dose de 0 c. c. 1, 0 c. c. 2, 0 c. c. 3, 0 c. c. 4, sur 0 c. c. 5 d'une dilution de globules de mouton, de cheval et de cobaye, préalablement lavés et émulsionnés, à raison de 1 p. 20 dans de l'eau physiologique à 9 p. 1.000. On porte ensuite à l'étuve à 37°, jusqu'à l'apparition de l'hémolyse.

Ainsi qu'il est de règle, le bon fonctionnement des bougies a été contrôlé après chaque filtration, par un ensemencement du filtrat. Nous avons aussi examiné, dans les mêmes conditions d'expérience, du sérum normal de lapin chauffé trente minutes à 55°, et filtré; nous n'avons jamais trouvé, dans ce cas, d'hémolysine active pour les globules étudiés.

Le tableau suivant donne les résultats des recherches. L'hémolyse est indiquée par le signe +; l'absence d'hémolyse par le signe —. Il est bien entendu que, tout en accordant une valeur sérieuse à cette mise en évidence de l'hémolysine, nous faisons toutes les réserves que nous pensons devoir faire à toutes les méthodes basées sur les filtrations. Il faudrait, pour que ces expériences aient une valeur indiscutable, que toutes les conditions tenant à la composition des bougies et aux réactions des milieux filtrés soient connues d'une façon précise. Il n'en est malheureusement rien, et nous ne devons accorder à la méthode des filtrations qu'une valeur relative. Elle ne prend tout son intérêt que lorsque, comme ici, les termes de comparaison sont assez nombreux pour fournir une conclusion intéressante.

Les indications de ce tableau montrent donc :

a) Que tous les streptocoques équinaux gourmeux possèdent une même lysine active pour les globules de cheval. Son action est ordinairement rapide; exceptionnellement, elle ne se manifeste qu'au bout de douze heures;

ORIGINE (abcès sous-glossiens ou parotidiens)	GLOBULES		
	Mouton	Cheval	Cobaye

1^{re} Streptocoques gourmeux.

1. Dole	+ en 30 min.	+ en 30 min.	+ en 30 min.
2. Bec Hellouin 402.	+ en 30 —	+ en 30 —	+ en 30 —
3. Sauteur	+ en 30 —	+ en 30 —	+ en 30 —
4. Mignon	+ en 30 —	+ en 30 —	+ en 30 —
5. Segala	+ en 60 —	+ en 30 —	+ en 60 —
6. Bec Hellouin 542.	+ en 60 —	+ en 60 —	+ en 60 —
7. — 480.	+ en 1 h. 30	+ en 1 h. 3	+ en 1 h. 30.
8. Bonnavois 634.	— en 12 h.	+ en 12 h.	— en 12 h.
9. — 734.	— en 12 h.	+ en 30 min.	+ en 60 min.
10. — 705.	+ en 30 min.	+ en 30 —	+ en 30 —
11. — 730.	+ en 45 —	+ en 30 —	+ en 45 —
12. — 714.	+ en 45 —	+ en 30 —	+ en 45 —
13. — 692.	+ en 30 —	+ en 30 —	+ en 30 —
14. Anglars Juillac 1254.	+ en 30 —	+ en 30 —	+ en 30 —
15. — 1271.	— en 12 h.	+ en 2 h.	— en 12 h.
16. Macon I	+ en 2 h.	+ en 60 min.	+ en 2 h.
17. Liquide céphalo-rachidien .	+ en 60 min.	+ en 30 —	+ en 60 min.
18. Pleurésie.	+ en 30 —	+ en 30 —	+ en 30 —
19. Abcès du garrot	— en 12 h.	+ en 60 —	— en 12 h.

2^{re} Streptocoques équins non gourmeux.

1. Alep.	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
2. 12 ^e Dragons.	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
3. 19 ^e Dragons.	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
4. 238	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.

3^{re} Streptocoques d'autres animaux.

1. Poule.	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
2. Mammite (vache) I	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
3. — — II	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
4. Veau I	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
5. — II	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
6. Porc.	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
7. Chien.	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.

4^{re} Streptocoques humains.

1. Otite	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
2. Pneumonie	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
3. Crachats	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
4. Urine.	+ en 60 min.	+ en 30 min.	+ en 60 min.
5. Sein.	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
6. Liquide céphalo-rachidien. .	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
7. Pleurésie	— en 12 h.	— en 12 h.	— en 12 h.
8. Erysipèle.	— en 12 h.	+ en 60 min.	+ en 60 min.

b) Les streptocoques équins isolés des lymphangites, et les streptocoques des autres animaux, ne sécrètent pas d'hémolysine capable de dissoudre les globules de mouton, de cheval ou de cobaye;

c) Deux streptocoques humains sur les huit étudiés ont une hémolysine active, dans un cas pour les trois espèces de globules, dans l'autre pour deux espèces.

Conclusions.

1° En se servant, comme antigène, de streptocoques tués par l'alcool-éther, la réaction de fixation permet de différencier d'une façon très nette le streptocoque gourmeux de tous les autres streptocoques du cheval, de l'homme ou des différents animaux.

2° Le streptocoque gourmeux sécrète une hémolysine active pour les globules de cheval, et fréquemment pour ceux de mouton et de cobaye, tandis que les autres streptocoques équins et ceux des autres animaux n'ont pas d'hémolysine active pour les mêmes globules.

Par contre, les streptocoques humains possèdent parfois une hémolysine identique à celle du streptocoque gourmeux.

3° En utilisant le procédé de la réaction de fixation et la recherche de l'hémolysine, on peut différencier le streptocoque gourmeux de tous les autres streptocoques connus.

(Institut Pasteur et Laboratoire militaire de recherches vétérinaires.)

LES RÉACTIONS D'IMMUNITÉ

VIS-A-VIS D'UNE NOUVELLE RACE ARTIFICIELLE

DE *B. COLI*

par PAUL FABRY,

Assistant de Bactériologie à l'Université de Liège.

La notion de race microbienne est, avant tout, basée sur les propriétés physiologiques. Dans ses *Etudes sur la bière*, Pasteur (1) écrivait. « Des formes semblables peuvent aussi cacher des différences profondes ». Plus loin, il fait remarquer que, dans une même espèce microbienne, existent des individus qui, cultivés isolément, développent des propriétés particulières distinctes de celles des autres individus de la même culture. Il y a là, ainsi que le disait Pasteur, un procédé pour créer des races distinctes. Ce procédé fut utilisé dans la suite pour isoler de nombreuses races de microbes. Depuis de Vries, bien des auteurs ont signalé des mutations microbiennes; à un moment donné on peut observer, souvent sans cause apparente, une modification de certaines colonies. Une propriété nouvelle apparaît ou une ancienne disparaît chez certains individus; ceux-ci, s'ils sont isolés, peuvent ou bien retourner au type primitif, ou bien persister comme race nouvelle. C'est ainsi que Massini (2) a observé, avec le *B. coli mutabile*, l'apparition de certaines colonies qui faisaient fermenter le lactose, et donnaient des colonies rouges en milieu Endo; cette propriété devint héréditaire et définitive. Il n'y a cependant pas dégénérescence dans ce cas, car la nouvelle race se multiplie vigoureusement sur tous les milieux. Le monde des microbes fourmille de ces êtres en voie de transformation. Une forme ou une propriété nouvelle, un état nouveau, apparaissent dans une culture pour une cause qu'il est très souvent impossible d'analyser. Dans un nouveau milieu de culture, certains individus se

(1) PASTEUR. *Etudes sur la bière*, p. 148.

(2) MASSINI. *Archiv für Hyg.*, 61, f. 3, p. 250.

modifient, s'adaptent mieux que les autres à la nouvelle situation. Les moins bien adaptés se multiplient de moins en moins, et font place aux adaptés qui, mieux en rapport avec de nouvelles conditions d'existence, prolifèrent de plus en plus, et finissent par constituer uniformément la foule des êtres de la colonie. En résumé, il doit se passer, dans ces cas de mutations microbiennes, ce quelque chose que l'on appelle, depuis Lamarck, « l'hérédité possible des caractères acquis ».

Outre l'action de circonstances naturelles, très difficiles à analyser, qui sont des agents de modifications microbiennes, il est possible d'introduire artificiellement, dans le milieu défini et limité qu'est une culture, un agent modificateur dont l'action suffisamment prolongée pourra influencer définitivement la descendance des microbes mis en sa présence. Les antiseptiques, ajoutés à des cultures de microbes en quantités telles qu'ils ne tuent pas ceux-ci, sont des agents modificateurs souvent très efficaces de la physiologie microbienne. J'ai montré (1) que le phénol, ajouté à du bouillon de *B. typhosus*, rend ce dernier beaucoup plus agglutinable par un typhus-sérum. Etudiant de même l'action modificatrice du phénol ajouté, en quantités croissantes, à du bouillon où j'ensemçais du *B. coli communior* (2), j'ai constaté qu'au bout de quelques jours ces cultures ne donnaient plus d'indol. Après une trentaine de jours de passages en milieu phénolé, ce *B. coli* repiqué dans les milieux les plus variés, et exempts de phénol ou de tout autre modificateur, continue à ne plus produire d'indol. On sait par les travaux de nombreux auteurs que le *B. coli* est susceptible de se modifier assez facilement sous telle ou telle influence. L'influence de lactose sur la mise en évidence d'une race nouvelle a été bien montrée par Massini (3); l'action du vert malachite à 0,1 p. 100 sur le *B. coli* produit, d'après C. Revis (4), des modifications permanentes de ses propriétés biochimiques (absence de production de gaz en présence de sucres, etc.). L'action d'un antiseptique ou d'un corps chimique étranger au milieu peut donc ou bien modifier les propriétés

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 21 février 1920 et 25 mai 1921.

(2) Le *B. coli communior*, de Dunham, est une race de *B. coli* qui, à la différence du *B. coli communis*, fait fermenter la saccharose.

(3) *Loc. cit.*

(4) C. REVIS. *Centr. f. Bakt.*, II, 31, n°s 1-4.

des microbes d'une culture, ou bien influencer défavorablement certains individus et permettre à d'autres, doués de propriétés différentes, de prendre le dessus, et de pulluler dans le milieu jusqu'à donner une culture pure.

A 10 cent. cubes de bouillon (Ph. 6,8) j'ajoute le premier jour 0 c. c. 4 de phénol à 5 p. 100, et j'ensemence le tube, avec une anse de platine, de *B. coli communior*. Ce bacille pousse très bien à cette concentration de phénol dans du bouillon, soit 0,05 p. 100. Le lendemain, j'ajoute à un autre tube, contenant 10 cent. cubes de bouillon, 0 c. c. 2 de phénol à 5 p. 100 et une anse de *B. coli* puisée dans le tube de la veille. J'arrive ainsi, en quelques jours, à accoutumer le *B. coli* à vivre dans 10 cent. cubes de bouillon additionné de 0 c. c. 4 de phénol à 5 p. 100, soit une concentration de 0,2 p. 100 de phénol pur. A ce moment le *B. coli*, ensemencé en eau peptone Dunham, continue à donner de l'indol [réaction d'Ehrlich positive] (1). Après une trentaine de jours, pendant lesquels le *B. coli* a été transplanté, chaque jour, dans un nouveau tube de bouillon additionné de 0,2 p. 100 de phénol, la propriété de former de l'indol disparaît ; elle peut reparaître après deux ou trois jours dans des milieux exempts de phénol ; il faut alors reporter le bacille dans du bouillon phénolé à 0,2 p. 100, et après un certain nombre de jours de passages dans ce milieu, le *B. coli* reste modifié quant à la propriété de ne plus produire d'indol ; c'est-à-dire qu'ensemencé en milieux sans phénol pendant une série indéfinie de repiquages, il donne en eau peptone Dunham une réaction d'Ehrlich négative. Le *B. coli*, ainsi modifié, fut successivement repiqué durant au moins seize mois dans l'eau peptone Dunham ; chaque jour il fut examiné au point de vue de sa production d'indol, et chaque fois la réaction d'Ehrlich fut trouvée négative. Comme contrôle un *B. coli* normal (de la même souche primitive) était traité de même et donnait chaque fois une réaction d'Ehrlich positive. Donc ce *B. coli* est resté modifié, sans influence toxique, depuis seize mois, étant chaque jour repiqué dans un milieu nutritif normal. Ce *B. coli* modifié conserve sa propriété nouvelle après passages sur gélose, même après plusieurs mois de

(1) Réactif d'Ehrlich : coloration rouge par le paradiméthylamidobenzaldéhyde.

repos à la température du laboratoire; en bouillon simple, lactosé, glucosé, etc., ou, comme je l'ai dit, en eau peptone Dunham, le *B. coli* modifié continue à ne plus produire d'indol. Il conserve, par ailleurs, toutes ses autres propriétés, fait fermenter les sucres, ne liquéfie pas la gélatine, etc.; examiné au microscope, il ne prend pas le Gram, et a la même forme et les mêmes colorations que le *B. coli* normal. Dans les cultures du début, celles où se trouve du phénol, on voit souvent des microbes plus petits et moins réguliers que dans les autres cultures. Ces différences de forme ne doivent, d'ailleurs, pas être nécessairement rattachées au fait du milieu phénolé, car divers auteurs ont décrit des variations de forme du *B. coli* en milieu normal, et l'on connaît le polymorphisme fréquent de ce microbe.

Il est souvent difficile, sinon impossible, *in vitro*, de remonter les races atténuées ou modifiées profondément; il faut pour cela le concours d'un organisme animal, chez lequel on injecte le microbe modifié. L'exaltation de virulence qui suit cette injection, jointe à des conditions de nutrition favorables, peut rendre au microbe ses propriétés primitives et typiques. Or ici il n'en est pas ainsi. Si l'on injecte dans la cavité péritonéale de cobayes ou de lapins une certaine quantité (0 c. c. 50 pour 400 grammes d'animal) de bouillon de *B. coli* sans indol, on observe dans certains cas la mort de l'animal par péritonite dans les quarante-huit heures. A l'autopsie on retrouve dans le péritoine, souvent même dans le sang du cœur, le *B. coli* injecté, qui reste modifié et qui,ensemencé en eau peptone Dunham, donne une réaction d'Ehrlich négative, donc continue à ne plus produire d'indol. Si, la dose étant moins forte, l'animal ne meurt pas (0 c. c. 2 pour 100 grammes), on peut, par ponction péritonéale le lendemain, retrouver le *B. coli* modifié injecté et toujours privé de la propriété de produire de l'indol. Des témoins, injectés dans les mêmes conditions de *B. coli* normal, donnent à la ponction péritonéale un *B. coli* produisant de l'indol. Il convient d'éviter toute contamination soit par la peau, soit par perforation intestinale pour ne pas introduire des *B. coli* ordinaires qui, évidemment, fausseraient la réaction. La persistance de la modification du *B. coli* se démontre mieux encore par l'exemple suivant: un cobaye

avait été injecté dans le péritoine avec du *B. coli* modifié ; l'animal ayant bien supporté l'injection, présente après quelques jours des phénomènes d'amaigrissement et de cachexie ; en palpant l'abdomen on sent une masse du volume d'une noix au milieu de la cavité péritonéale ; cette masse, ponctionnée dix jours après l'injection, contenait du pus ; ce pus ensemencé sur gélose montre après vingt-quatre heures une culture pure de *B. coli*, Gram négatif, qui fait fermenter les sucres, ne liquéfie pas la gélatine, etc., mais continue à ne pas donner d'indol.

Voilà donc un *B. coli* modifié, retiré après dix jours de la cavité péritonéale d'un cobaye où il a provoqué un abcès à évolution lente et qui reste néanmoins modifié quant à la propriété de ne plus produire d'indol. La nouvelle race semble donc fixe, puisque par un moyen aussi efficace que le passage dans l'animal, il n'est pas possible de lui rendre ses propriétés perdues. De même le passage pendant longtemps sur des milieux nutritifs variés ne rend pas à ce *B. coli* la faculté de produire de l'indol. Il ne semble pas y avoir de rapport entre la quantité d'indol produite et la virulence ; néanmoins, comme j'avais fait agir sur ce *B. coli* un toxique comme le phénol, capable de l'atténuer, j'ai institué une série d'expériences pour comparer la virulence du *B. coli* modifié avec celle du *B. coli* normal de la même souche primitive. Les résultats ont été peu nets ; d'une manière générale, la virulence du microbe normal est plus grande vis-à-vis des cobayes ou des lapins, mais cette différence n'est pas très marquée. On ne peut donc pas considérer la perte de la propriété indoligène comme une *atténuation*, mais bien comme une *modification*, car toutes les autres propriétés biochimiques du nouveau microbe se manifestent avec autant d'énergie que chez le type primitif. La virulence est évidemment affaiblie par les passages en milieu phénolé, mais promptement elle réapparaît par passages en milieux normaux.

Il était intéressant d'approfondir l'étude du nouveau *B. coli* par l'étude des réactions d'agglutination, de déviation de l'alexine, etc... Dans ce but, ayant immunisé des cobayes et lapins contre le *B. coli communior normal* et contre le *B. coli communior* sans indol, j'ai pu comparer l'action des sérums ainsi obtenus sur ces deux microbes.

L'étude des propriétés agglutinantes des sérums des cobayes et lapins immunisés contre le *B. coli* normal montre que ce sérum agglutine le *B. coli* normal et le *B. coli* modifié à peu près avec la même intensité. L'agglutination du *B. coli* modifié semble accrue quand on se sert de spécimens de ce *Coli* récemment cultivés en milieu phéniqué ; mais cette différence n'est pas considérable.

Les expériences exécutées avec du sérum d'animaux immunisés contre le *B. coli* modifié montrent que ce sérum n'a acquis *aucun pouvoir agglutinant contre le B. coli normal*, mais agglutine *exclusivement* le *B. coli* modifié. Le *B. coli* modifié, cultivé récemment en milieu phéniqué, est plus agglutinable encore par le sérum *anticoli* modifié.

Plus de trente expériences de ce type furent exécutées successivement avec les sérums de douze cobayes ou lapins différents, et toutes donnèrent des résultats superposables. Comme contrôle je me suis servi, soit de sérum de cobaye *anticoli* normal, soit de sérum de lapin *anticoli* normal. Ces sérums se comportaient de façon identique et agglutinaient avec la même intensité à peu près les deux *B. coli* étudiés ici. Les tubes à agglutination étaient mis à l'étuve à 37° pendant deux heures, puis placés à la glacière ; la lecture était faite le lendemain. Le tableau suivant montre une de ces expériences faite avec du sérum de cobayes.

Sérum anticoli normal.				Sérum anticoli modifié.		
DILUTIONS	NUMÉRO	C. NORMAL	C. MODIFIÉ	NUMÉRO	C. NORMAL	C. MODIFIÉ
1/30	1	+++	+++	1	—	+++
1/60	2	+++	+++	2	—	+++
1/120	3	+++	+++	3	—	+++
1/240	4	+++	+++	4	—	++
1/480	5	++	++	5	—	+
1/960	6	+	+	6	—	—
1/1920	7	—	—	7	—	—
1/3840	8	—	—	8	—	—
T. sans sérum.	9	—	—	9	—	—

+++ , aggl. totale ; ++ , aggl. forte ; + aggl. assez forte ; — pas d'aggl.

Cet exemple d'expérience montre que le *B. coli* modifié, tout en étant fortement agglutinable par le sérum *anticoli* normal, ne provoque, quand il est injecté au cobaye, que la formation d'agglutinines qui lui sont rigoureusement spécifiques et qui n'ont, par conséquent, aucune action sur le *B. coli* normal de la même souche primitive, ou sur toute autre race de *B. coli*.

Des expériences comparables furent exécutées avec du sérum de lapin *anticoli communior* normal, ou *anticoli communior* modifié. Ces expériences donnèrent des résultats identiques dans tous les cas. Je crois inutile de multiplier les exemples, toutes les expériences étant absolument identiques quant au fait essentiel ici, c'est-à-dire dans l'absence totale d'agglutination du *B. coli* normal par les sérums *anticoli* modifié, soit de cobaye, soit de lapin. Le contrôle était fourni par un tube sans sérum, ce qui permettait de constater l'absence d'agglutination spontanée. Un autre contrôle était fourni par un sérum de cobaye ou de lapin neufs, qui, évidemment, n'agglutinait aucun *B. coli*.

Ces expériences montrent que le *B. coli* sans indol a subi une modification assez profonde de sa physiologie, puisque injecté aux animaux il fait apparaître dans leur sérum des anticorps d'une spécificité telle qu'ils n'impressionnent pas le microbe normal de la même souche primitive. Ces faits semblent prouver l'apparition d'une vraie race nouvelle. D'autre part, le fait que le *B. coli* modifié est agglutiné par le sérum *anticoli* normal prouve qu'il y a bien là persistance d'un *B. coli*, et non pas une contamination. La parenté primitive de ces deux *coli* se retrouve dans la présence d'agglutinines communes dans le sérum *anticoli* normal, et c'est seulement une différenciation plus intime qui peut expliquer, me semble-t-il, la présence dans le sérum *anticoli* modifié de ces agglutinines si rigoureusement spécifiques. Ces résultats rappellent ceux obtenus par Gay et Claypole (1) avec un *B. typhosus* cultivé sur géloses-ang, ou sur gélose ordinaire. L'immun-sérum obtenu par l'injection du microbe-sang agglutine indifféremment les deux races, tandis que l'immun-sérum obtenu par l'injection du microbe-gélose

(1) GAY et CLAYPOLE. *Arch. of Int. Med.*, 42, décembre 1913, p. 615-627.

agglutine celui-ci exclusivement (1). Il en est de même ici.

Les méthodes sérologiques employées pour distinguer entre elles les diverses espèces et les diverses races microbiennes ne donnent pas toutes des résultats aussi rigoureux les unes que les autres. La réaction de l'agglutination est, peut-être, celle qui nous renseigne le mieux sur la spécificité d'une race. La réaction de fixation de l'alexine est moins rigoureuse et ne permet guère de distinguer entre elles les diverses races d'une même espèce [Bordet et Sleeswyck (2), Gay et Claypole (3)]. Les diverses races d'une même espèce possèdent des antigènes communs à l'espèce et d'autres qui sont spécifiques à la race. Ces antigènes, injectés à l'animal, provoquent l'apparition d'anticorps correspondants. La réaction d'agglutination permet de mettre en évidence cette spécificité très grande de certains antigènes caractérisant sérologiquement chaque race. J'ai essayé l'épreuve de la fixation de l'alexine comme moyen de distinguer le *B. coli communior* normal et la nouvelle race, le *B. coli communior* modifié ne produisant plus d'indol (4). Je ne pus pas distinguer, par cette méthode, ces deux *B. coli*. Le résultat le plus frappant de l'ensemble des expériences était que le *B. coli* modifié semblait avoir perdu le pouvoir de fixer l'alexine, même en présence du sérum *anticoli* modifié.

En 1897, Malvoz (5) démontra que certaines substances chimiques (formaline, safraline, etc.) agglutinaient les microbes. Il signala que la formaline agglutinait fortement le *B. typhosus* et non pas le *B. coli*. Poursuivant l'étude des propriétés biologiques du *B. coli* sans indol, j'ai pensé à essayer l'agglutination de ce microbe par les agents chimiques (acide acétique et formaline). L'agglutination par l'acide acétique était très nette, mais le *B. coli* sans indol n'était ni plus, ni moins, agglutiné par ce réactif que le *B. coli* normal. La formaline, par contre, agglutine sensiblement le *B. coli* sans indol. On sait que le *B. typhosus* est fortement agglutiné par ce réactif à la différence du *B. coli* (Malvoz). Dans le but de vérifier une

(1) BORDET. *L'immunité*, 1920, p. 561.

(2) BORDET et SLEESWYCK. *Ces Annales*, 24, 1910, p. 476-494.

(3) *Loc. cit.*

(4) *C. R. Soc. de Biol.*, 86, 27 mai 1922, p. 113.

(5) MALVOZ. *Ces Annales*, 11, 1897, p. 582-589.

« Eberthisation » possible, j'ai essayé l'agglutination du *B. coli* sans indol par des sérums antityphique, antipara A et antipara B ; aucune agglutination ne se produisit. On ne peut donc pas penser ici à une « Eberthisation ». Cette différence d'agglutination par une substance chimique telle que la formaline n'est-elle pas due à une modification profonde du chimisme microbien décelée déjà par la suppression de la fonction indoligène ? Peut-être aussi la modification du microbe produit-elle des changements physiques se traduisant par une plus grande aptitude à l'accrolement et à la floculation ?

CONCLUSION

Le *B. coli communior*, cultivé pendant au moins un mois et repiqué chaque jour dans des tubes de bouillon additionnés de quantités croissantes de phénol jusqu'à la limite de 0.2 p. 100, perd la propriété de donner de l'indol en eau peptone Dunham (réaction d'Ehrlich négative). Cette modification se transmet héréditairement et indéfiniment (seize mois au moins) alors que le microbe est replacé dans les milieux nutritifs les plus variés et ne contenant, bien entendu, aucune trace de phénol ou de tout autre agent modificateur. Ce *B. coli* contient des substances qui se comportent comme des antigènes différents de ceux de la souche primitive, car, injecté aux animaux, il provoque dans leur organisme l'apparition d'anticorps (agglutinines qui sont rigoureusement spécifiques vis-à-vis de ce nouveau *B. coli*. Ces agglutinines ne réagissent nullement avec les antigènes du *B. coli* normal). Cependant le *B. coli* modifié est bien une race du groupe *B. coli communior*, car, outre que ses propriétés biochimiques sont inchangées (à part la fonction indoligène) il reste agglutinable à un taux très élevé par le sérum *anticoli communior* normal. Ce sérum n'agglutinait lui-même que les *B. coli communior* et non pas les *coli communis*, etc. Il y a là l'indice de la parenté primitive des deux races dont l'une dérive, d'ailleurs, de l'autre. Les antigènes caractérisant le *coli communior* lui ont été conservés puisque ce nouveau *coli* réagit vis-à-vis d'eux ; mais en plus l'action prolongée du phénol lui a imprimé une vicia-

tion nutritive héréditaire telle que la chimie cellulaire en a été en partie modifiée, et que certaines substances existent dans ce nouveau *coli* qui peuvent agir comme antigènes spécifiques. Cette viciation de la biochimie de ce bacille se révèle, me semble-t-il, très bien par la suppression héréditaire de la production d'indol; en effet, ceci révèle une diminution, ou une transformation du pouvoir de digestion, de la capacité de sécréter les substances, diastases ou catalyseurs, qui détruisent certaines grosses molécules organiques. On sait, en effet, que l'indol est produit par l'action des microbes sur le tryptophane contenu dans la peptone des milieux de culture. Cette modification biochimique ne peut cependant pas être appelée une dégénérescence, un amoindrissement de la vie des microbes puisqu'ils continuent à se développer abondamment sur tous les milieux qui leur sont propres, et qu'injectés aux animaux ils les tuent à la même dose sensiblement que le microbe normal de la même souche primitive. Il est évident qu'un microbe dégénéré, qui tuerait un animal auquel il aurait été injecté, non seulement serait régénéré, mais encore retrouverait dans cette exaltation toutes ses propriétés primitives. Dans ce cas-ci, le *B. coli*, même après avoir tué des cobayes, reste modifié quant à l'absence de production d'indol et quant à ses propriétés antigéniques. Il est probable que l'action du phénol, incapable de tuer, à la dose de 0,2 p. 100, des microbes qui y ont été progressivement adaptés, a pu néanmoins modifier profondément leur physiologie et leur métabolisme; cette empreinte du toxique, étant continuée pendant plusieurs générations, a successivement dû éliminer les individus non adaptables à cette nouvelle circonstance; les autres, plus résistants, plus plastiques, ont transmis héréditairement à leur descendance les caractères nouveaux de leur physiologie. L'espace de temps (16 mois) relativement long qui s'est écoulé depuis l'apparition de cette nouvelle race permet, je crois, de dire qu'elle est définitivement séparée de la souche primitive, d'où elle dérive. Ces faits prouvent, une fois de plus, la plasticité des races microbiennes et la possibilité de démontrer chez elles, par l'expérimentation du laboratoire, les lois générales de l'évolution.

LES EFFETS DU PNEUMOTHORAX ARTIFICIEL CHEZ LE LAPIN

par le Dr JEAN S. VALTIS.

Frédéric Schaw (1), se basant sur l'action si favorable du pneumothorax artificiel chez l'homme, a étudié ses effets en injectant des bacilles tuberculeux humains dans la trachée ou dans la circulation sanguine de lapins préalablement opérés de pneumothorax.

Ces expériences ont porté sur quatre lapins.

Il pratique chez deux d'entre eux un pneumothorax du poumon droit avec pression terminale variant entre 0 + 2 et + 2 + 4 d'eau. Immédiatement après, il injecte 1 milligramme de bacilles tuberculeux humains virulents, au premier *dans la veine de l'oreille* et à l'autre *dans la trachée*.

Il sacrifie le premier animal seize jours après l'infection et il constate dans le lobe inférieur du poumon droit des lésions de tuberculose caséeuse et deux tubercules miliaires au sommet du lobe supérieur du même poumon. Les autres organes sont normaux.

Le second animal est sacrifié cinq jours après l'inoculation, et on trouve dans le lobe inférieur du poumon droit six tubercules miliaires, tandis que le poumon gauche est sain.

Chez les deux autres lapins, il pratique le pneumothorax immédiatement après l'inoculation de 1 milligramme de bacilles tuberculeux humains virulents dans la veine.

Il sacrifie l'un d'eux vingt jours après l'inoculation et trouve des lésions de tuberculose caséeuse au lobe moyen et au lobe inférieur du poumon droit.

Les autres organes ne présentent rien d'anormal.

Chez l'autre lapin, huit jours après l'inoculation, il trouve un certain nombre de tubercules miliaires sur le poumon droit, tandis que le poumon gauche est sain.

(1) *Amer. Review of tub.*, t. III, septembre 1919, p. 440.

Contrairement donc à son attente, il constate que, chez ces animaux, le poumon du côté opéré devient tuberculeux, alors que le poumon opposé reste sain.

Après lui, H. J. Corper, Sailing Simon et O. B. Reuch (1), H. J. Corper et O. B. Reuch (2) ont repris les mêmes expériences chez le lapin, les premiers en faisant un hydrothorax et les seconds un pneumothorax.

Ces auteurs assurent ne pas avoir remarqué de différences appréciables dans le développement des lésions tuberculeuses chez les animaux opérés et chez les témoins.

Sur les indications de notre maître, M. le professeur Calmette, nous avons repris ces expériences dans son laboratoire, à l'Institut Pasteur, avec quelques modifications qui seront ci-après indiquées:

Nos essais ont porté sur six lapins adultes, du poids moyen de 2 kilogr., dont deux ont été conservés comme témoins.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE.

Le lapin 0-81 est opéré le 10 février de pneumothorax artificiel du poumon droit.

Pour cette opération l'animal est fixé sur l'appareil de contention de *Malassez*. Pour les insufflations, on utilise l'appareil à pneumothorax de *Küss*. Au moyen du perforateur de *Küss*, on traverse la paroi costale et la plèvre au niveau du 4^e espace intercostal.

On observe alors des oscillations franches et une tension initiale de 0-4 d'eau. Après insufflation de 60 cent. cubes d'azote la pression monte à + 2 + 4 d'eau.

Pour les insufflations ultérieures, nous avons utilisé une petite aiguille de seconde insufflation et maintenu la même pression terminale.

Le 13 février, seconde insufflation avec la même pression terminale.

Le 14 février, nous essayons de voir aux rayons X les résultats des insufflations. Il nous a été impossible de distinguer les limites du moignon pulmonaire, mais nous avons constaté nettement un refoulement du cœur du côté opposé, ainsi qu'un abaissement de l'hémi-diaphragme droit.

Le 15 février 1922, nouvelle insufflation dans les mêmes conditions.

Le 18	—	—
Le 20	—	nous injectons dans la veine de l'oreille 0 gr. 01 de bacilles humains (souche dénommée <i>Humaine Ralli</i>).
Le 24	—	insufflation d'azote avec même tension terminale.

Le 28	—	—
Le 2 mars 1922,	—	—
Le 6	—	—

(1) *Amer. Review of tub.*, Balt., 1920.

(2) *Amer. Review of tub.*, Balt., 1920.

Le 9 mars 1922, insufflation d'azote avec même tension terminale.

Le 13	—	—	—
Le 17	—	—	—
Le 22	—	—	—
Le 26	—	—	—
Le 30	—	—	—
Le 4 avril 1922,	—	—	—
Le 9	—	—	—
Le 14	—	—	—

Le 15 avril 1922, c'est-à-dire cinquante-deux jours après l'infection, l'animal est sacrifié. A l'autopsie, les deux poumons présentent des granulations tuberculeuses qui sont surtout abondantes sur le poumon droit correspondant au côté opéré que nous avons trouvé rétracté vers le hile.

Pas de lésions macroscopiques sur les autres organes.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE.

Le lapin B. 82 a été opéré le 10 février 1922 de pneumothorax artificiel du poumon droit. Nous avons utilisé la même technique et obtenu une tension terminale de 0 + 4 d'eau.

Le 13 février 1922, nouvelle insufflation dans les mêmes conditions.

Le 14	—	même image que le précédent aux rayons X.	—	—
Le 15	—	nouvelle insufflation avec pression terminale 0 + 4 d'eau.	—	—
Le 18	—	—	—	—
Le 21	—	—	—	—
Le 22	—	nous injectons dans la trachée de l'animal 0 gr. 01 de bacilles humains (souche dénommée <i>Humaine Ratti</i>).	—	—
Le 24	—	insufflation d'azote avec pression terminale de 0 + 4 d'eau.	—	—
Le 28	—	—	—	—
Le 4 mars 1922,	—	—	—	—
Le 8	—	—	—	—
Le 11	—	—	—	—
Le 15	—	—	—	—
Le 19	—	—	—	—
Le 22	—	—	—	—
Le 26	—	—	—	—
Le 30	—	—	—	—
Le 4 avril 1922,	—	—	—	—
Le 9	—	—	—	—
Le 13	—	—	—	—
Le 17	—	—	—	—

Le 20 avril 1922, soit cinquante-six jours après l'inoculation, l'animal est sacrifié. A l'autopsie, on trouve le poumon droit rétracté vers le hile et, sur les deux poumons, des lésions de tuberculose ulcéro-caséuse beaucoup plus accentuées du côté droit correspondant au poumon opéré.

Pas de lésions macroscopiques sur les autres organes.

TROISIÈME EXPÉRIENCE.

Le lapin 0-92 reçoit dans la trachée, le 20 mars 1922, une injection de 0 gr. 01 de bacilles humains (souche dénommée *Humaine Ratti*).

Le 27 avril 1922, c'est-à-dire trente-sept jours après l'inoculation, nous

pratiquons, toujours dans les mêmes conditions, un pneumothorax artificiel du poumon droit avec tension terminale $0 + 4$ d'eau.

Le 30 avril 1922, nouvelle insufflation avec tension terminale $0 + 4$ d'eau.

Le 2 mai 1922, — — — — —

Le 6 — — — — —

Le 9 — — — — —

Le 12 — insufflation avec pression terminale $0 + 4$ d'eau.

Le 15 — c'est-à-dire cinquante-cinq jours après l'inoculation, l'animal meurt après l'insufflation. A l'autopsie, nous trouvons le poumon droit rétracté vers le hile et des lésions de pneumonie caséuse sur les deux poumons, surtout prononcées à droite.

Les autres organes ne présentent macroscopiquement aucune lésion de tuberculose.

QUATRIÈME EXPÉRIENCE.

Le lapin 0-91 reçoit, le 20 mars 1922, 0 gr. 01 de bacilles humains (*Humaine Ratti*) dans la veine de l'oreille.

Le 27 avril 1922, soit trente-sept jours après la première infection, nous injectons de nouveau dans la trachée 0 gr. 01 du même bacille.

Le 20 mai 1922, soit vingt-trois jours après la seconde infection, nous pratiquons un pneumothorax artificiel du poumon droit avec pression terminale $0 + 4$ d'eau.

Le 23 mai 1922, insufflation d'azote dans les mêmes conditions.

Le 26 — — — — —

Le 29 — — — — —

Le 1^{er} juin 1922, — — — — —

Le 4 — — — — —

Le 7 — — — — — après laquelle l'animal meurt.

A l'autopsie, le poumon droit est rétracté vers le hile et des lésions de pneumonie caséuse, plus accentuées à droite, existent sur les deux poumons.

Les autres organes sont indemnes.

CINQUIÈME EXPÉRIENCE.

Le lapin témoin B 84 est inoculé par la voie trachéale, le 14 février 1922, avec 0 gr. 01 de bacilles humains (*Humaine Ratti*).

Sacrifié le 10 avril 1922, soit cinquante-six jours après l'infection, l'animal présente d'assez nombreuses granulations pulmonaires. Cependant les lésions sont nettement moins prononcées que chez le lapin infecté dans les mêmes conditions, mais opéré de pneumothorax.

SIXIÈME EXPÉRIENCE.

Le lapin témoin B-96 reçoit dans la veine de l'oreille, le 11 février 1922, 0 gr. 01 de bacilles humains (*Humaine Ratti*).

Le 21 mars 1922, soit trente-sept jours après la première infection, on injecte de nouveau dans la trachée 0 gr. 01 du même bacille.

Le 30 avril 1922, soit trente-huit jours après la seconde infection, l'animal est sacrifié. Ses deux poumons sont parsemés de granulations tuberculeuses plus abondantes sur les sommets et les bords postérieurs. Ces lésions sont infiniment moins importantes que les lésions du lapin correspondant, traité par le pneumothorax artificiel.

CONCLUSIONS

Il ressort de nos expériences :

1° Que *les lapins infectés expérimentalement de tuberculose humaine, et opérés ensuite de pneumothorax artificiel, présentent des lésions de tuberculose pulmonaire beaucoup plus avancées et plus étendues que les animaux témoins*;

2° Les mêmes résultats sont obtenus lorsque l'opération du pneumothorax est faite *avant l'infection expérimentale*;

3° *Chez les lapins tuberculeux, opérés de pneumothorax artificiel, les lésions pulmonaires sont plus accusées sur le poumon opéré.*

Nous constatons donc avec Schaw que, contrairement à ce qu'on observe chez l'homme tuberculeux, le pneumothorax facilite, chez le lapin infecté, le développement des lésions tuberculeuses, notamment du côté opéré.

(Laboratoire de M. le professeur Calmette à l'Institut Pasteur.)

Le Gérant : G. MASSON.